



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## FLUORESCENČNÍ DETEKCE V ANALÝZE PATOGENŮ

FLUORESCENCE DETECTION IN PATHOGEN ANALYSIS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Tomečková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jaroslava Bezděková

BRNO 2019

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1468/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Kristýna Tomečková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jaroslava Bezděková**

### Název bakalářské práce:

Fluorescenční detekce v analýze patogenů

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše zaměřená na detekci patogenů
2. Příprava a optimalizace molekulově imprintovaného polymeru selektivního pro zvolený patogen
3. Fluorescenční detekce patogenu izolovaného pomocí připraveného polymerního materiálu
4. Přehledné zpracování dat a vyhodnocení postupu vyvinutého pro detekci patogenů

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

---

Kristýna Tomečková  
student(ka)

---

Ing. Jaroslava Bezděková  
vedoucí práce

---

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1. 2019

---

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá izolací a detekcí bakterií a to pomocí metody zvané molekulový imprinting ve spojení s fluorescenční mikroskopií. Teoretická část práce se soustřeďuje na porovnání vyvinuté metody s dosud využívanými metodami. Praktická část byla zaměřena na přípravu a optimalizaci molekulově imprintovaných polymerů na dvou různých nosičích – multititrační destičce a magnetických částicích. Jako otiskovaný templát byla vybrána bakterie *Enterococcus faecalis* a její kompetitor bakterie *Staphylococcus aureus*.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with isolation and detection of bacteria. The used method is called molecular imprinting and is connected with fluorescence microscopy. The theoretical part concentrates on comparison of the developed method with methods that have been used till now. The practical part describes preparation and optimization molecularly imprinted polymers. These polymers were prepared on two different carriers – multititration wellplate and magnetic particles. The bacteria used as imprinted template was *Enterococcus faecalis*. *Staphylococcus aureus* was used as its competitor.

## **KLIČOVÁ SLOVA**

Molekulově imprintovaný polymer, patogen, fluorescence, magnetické částice

## **KEYWORDS**

Molecularly imprinted polymer, pathogen, fluorescence, magnetic particles

TOMEČKOVÁ, Kristýna. *Fluorescenční detekce v analýze patogenů*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113591>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Jaroslava Bezděková.

## PROHLAŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
Kristýna Tomečková

## Poděkování

*Tímto bych především chtěla poděkovat své vedoucí paní Ing. Jaroslavě Bezděkové za všechny její čas, který věnovala na pomoc, při vypracování této práce. Děkuji za její ochotu, rady, trpělivost a asistenci při měření. Dále bych chtěla poděkovat doc. Mgr. Markétě Vaculovičové Ph.D., která mi také poskytla mnoho rad a nápadů. Poděkování jí patří i za její vstřícnost a umožnění měřit na Ústavu chemie a biochemie na Mendelově univerzitě. Za jeho nápady a rady děkuji i panu Ing. Lukáši Nejdlovi, Ph.D. a všem přítomným na Mendelově univerzitě v Brně za jejich přívětivé chování a trpělivost.*

## OBSAH

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | ÚVOD .....   | 6  |
| 2     | TEORETICKÁ ČÁST .....  | 7  |
| 2.1   | Současné metody detekce patogenů .....                           | 7  |
| 2.1.1 | Kultivační metody .....  | 7  |
| 2.1.2 | MALDI-TOF MS .....   | 7  |
| 2.1.3 | Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....                         | 7  |
| 2.1.4 | ELISA testy .....  | 8  |
| 2.2   | Molekulově imprintované polymery (MIP) .....                     | 9  |
| 2.3   | Funkční monomer (FM) .....                                       | 11 |
| 2.4   | Počátky imprintingu mikroorganismů .....                         | 13 |
| 2.5   | Molekulově imprintované polymery na magnetických částicích ..... | 13 |
| 2.6   | Fluorescenční mikroskopie .....                                  | 14 |
| 3     | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....  | 16 |
| 3.1   | Popis experimentu .....  | 16 |
| 3.2   | Materiály .....  | 16 |
| 3.3   | Přístrojové vybavení .....                                       | 16 |
| 3.4   | Metody .....   | 17 |
| 3.4.1 | Příprava bakterií .....  | 17 |
| 3.4.2 | Příprava MIP a NIP v destičce .....                              | 17 |
| 3.4.3 | Detekce pomocí fluorescenční mikroskopie .....                   | 18 |
| 4     | VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE .....                                  | 19 |
| 4.1   | Optimalizace promývacího roztoku .....                           | 19 |
| 4.2   | Optimalizace koncentrace dopaminu .....                          | 20 |
| 4.3   | Optimalizace adsorpční kinetiky .....                            | 22 |
| 4.4   | Výběr vhodného nosiče .....                                      | 23 |
| 4.5   | Ověření vazebných vlastností- selektivita .....                  | 25 |
| 4.6   | Reálný vzorek .....  | 26 |
| 5     | ZÁVĚR .....  | 28 |
| 6     | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....                                   | 30 |
| 7     | ZDROJE .....   | 31 |

# 1 ÚVOD

Detekce patogenů hraje důležitou roli v identifikaci a léčbě řady onemocnění. Kontrola přítomnosti patogenů je nezbytná především ve třech průmyslových oblastech: potravinářství, zdravotnictví a kontrola životního prostředí, kde by selhání detekce mělo katastrofální důsledky. V současné době se pro identifikaci používají klasické mikrobiologické metody, metody identifikace pomocí polymerázové řetězové reakce a imunologické metody jako je například enzymově značený imunotest s využitím pevné fáze (ELISA). Mikrobiologické metody, které zahrnují kultivaci a počítání bakterií, jsou časově náročné. Pro použití metody polymerázové řetězové reakce (PCR) je nezbytná izolace DNA, znalost specifické sekvence pro stanovovanou bakterii, pro jejíž stanovení jsou navrženy primery. Imunochemické detekce jsou omezené použitím vhodné monoklonární protilátky a jsou finančně náročné. Lze tedy říct, že současně používané techniky jsou zdoluhavé, nákladné a náročné. Je proto nutné věnovat se vývoji moderních, rychlých, spolehlivých a nenákladných technik pro identifikaci bakterií [1].

Technika molekulového imprintingu se jeví jako velmi slibná alternativní metoda izolace patogenů. Molekulově imprintované polymery (MIP) ve své struktuře obsahují vazebná místa specifická pro otiskovanou molekulu/strukturu (templát). Mohou tedy napodobit rozpoznávací a vazebnou schopnost přirozených biomolekul, jako jsou protilátky a enzymy. Oproti přírodním molekulám však mají MIP řadu výhod, mezi které patří: vysoká schopnost rozpoznávání, chemická a mechanická stabilita, snadná příprava a nízké náklady [1]. K detekci bakterií izolovaných použitím techniky molekulového imprintingu bylo použito velmi citlivé fluorescenční detekce, konkrétně fluorescenční mikroskopie.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Současné metody detekce patogenů

Bakteriální kontaminace potravin a s nimi související onemocnění patří mezi jedny z nejzávažnějších problémů, které jsou řešeny nejen v rozvojových zemích, ale i v zemích vyspělých včetně České republiky. Státní zemědělská inspekce ČR kontroluje bezpečnost potravin na trhu, a ne jednou byly objeveny mikrobiálně kontaminované potraviny, které musely být z trhu z důvodů bezpečnosti staženy. V dnešní době jsou pro detekci mikroorganismů využívány různé metody, mezi které patří např. metody kultivační nebo metoda PCR. V následujících kapitolkách budou diskutovány výhody a nevýhody nejběžněji používaných metod detekce bakterií [2, 3].

#### 2.1.1 Kultivační metody

Tato metoda je dosud nejstarší metodou detekce bakterií a zůstává i nadále standardní metodou. Avšak vzhledem k její časové náročnosti bylo nutné vyvíjet i jiné metody. Jen pro získání negativních výsledků je potřeba 4-9 dnů, pro potvrzení pozitivních výsledků něco mezi 14-16 dní. Časová náročnost je tedy hlavním nedostatkem této metody zejména pro medicínské účely.

Pro detekci konkrétních druhů bakterií se využívají různá selektivní média. Mohou obsahovat inhibitory (pro zastavení nebo zpomalení růstu necílených buněk) nebo konkrétní substráty, které mohou být degradovány pouze určitým typem bakterií [4].

#### 2.1.2 MALDI-TOF MS

Jednou z dalších metod, které se využívají pro detekci mikroorganismů, je MALDI-TOF MS. Tato metoda se osvědčila především svou vysokou účinností a je čím dál více využívána. Hlavní výhodou je zejména její citlivost a rychlost [5, 6]. Na druhou stranu pořizovací cena tohoto přístroje je vysoká a problémem může být také nutná příprava vzorku ještě před měřením. Nejvíce používanou a opakovatelnou metodou přípravy je odebráním jedné kolonie z bakterií kultivovaných na agaru. Což nás přivádí zpět k časové náročnosti kultivace. Další možností izolace je za pomoci protilátek [7].

#### 2.1.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Další možnou metodou, která využívá v detekci mikroorganismů, je PCR. Tato metoda byla objevena již v polovině 80. let a je stále vysoce využívána pro detekci bakterií. Je založena na izolaci, amplifikaci (znásobení) a kvantifikaci krátkých úseků DNA.

Metoda PCR sice zabírá méně času než kultivační metody, ale i tak je zapotřebí vykonat několik kroků, ještě před samotnou analýzou. Průměrně můžeme získat výsledky v rozmezí 5-24 hodin [3, 8]. U analýzy mikroorganismů se provádí následující kroky:

- Izolace DNA
- Amplifikace DNA – PCR metoda
- Purifikace DNA
- Sekvenování DNA pomocí gelové kapilární elektroforézy

PCR je založena na amplifikaci (znásobování) genů a jejich RNA-transkriptů. Každý z testů PCR vyžaduje přítomnost enzymu DNA-polymerázy, vzorku DNA, primerů a nukleotidů [9].

Templát extrahované DNA je úsek, který chceme znásobit. Klíčem k replikaci tohoto úseku DNA, který připojuje jednotlivé nukleotidy k sobě pro dosažení PCR produktu, je enzym DNA-polymeráza. Primery jsou krátké a jednovláknové úseky NK (DNA nebo RNA) nebo proteinu (dlouhého několik bází), kdy volba primeru určuje, který úsek bude amplifikován. Pro PCR amplifikaci se DNA získává z požadovaného vzorku a přidává se do reakční zkumavky spolu s PCR pufrem, primery, DNA-polymerázou a deoxynukleotidy. Reakční zkumavka je poté vložena do termocykleru, kde probíhá opakovaná replikace DNA. Probíhá ve třech krocích:

- Denaturace: zahřátí zkumavky na 94 °C- slouží k rozvolnění DNA dvoušroubovice na dva jednotlivé řetězce
- Hybridizace: probíhá většinou při 50-65 °C, primery nasedají na konkrétní místa na jednotlivých vláknech denaturované DNA a ohraničují tak místo, které má být amplifikováno
- Elongace: probíhá při teplotě 72 °C, dochází ke vzniku nových komplementárních DNA řetězců [9, 10]

PCR je vysoce přesná a citlivá metoda. Výhodou také je, že nedojde ke kontaminaci vzorku. Mezi nevýhody patří to, že je třeba vzorek DNA před samotnou analýzou izolovat a vysoká cena analýzy [10].

#### **2.1.4 ELISA testy**

Imunotesty se využívají v oblasti lékařství, životního prostředí nebo potravinářství pro analýzu proteinů, mikroorganismů, sekvencí DNA a mnoha dalších látek.

Protilátky jsou unikátní přírodní skupinou glykoproteinů, známé jako imunoglobuliny. Jsou produkovány diferenciovanými B buňkami. Vzhledem ke specifickým interakcím mezi protilátkou a jí odpovídajícím antigenem se protilátky využívají jako rozpoznávací prvky pro imunotesty [10].

ELISA je bezesporu jednou z nejvyužívanějších metod pro detekci patogenů. Dnes se můžeme setkat s několika typy těchto testů, mezi které patří: přímá, nepřímá, kompetitivní a tzv. „sendvičová“ ELISA, která je z těchto druhů testů nejběžnější [8, 11].

Sendvičová ELISA je nejefektivnější zejména proto, že využívá dvě protilátky. Primární protilátka je imobilizovaná na dně jamky mikrotitrační destičky. Zvolený antigen (bakteriální buňka nebo toxin ze vzorku jídla) se váže na primární protilátku. Poté je přidána druhá protilátka, která je označena enzymem. Tato protilátka se naváže na antigen. Zbylé nenavázané protilátky jsou vymyty. Výsledkem je tedy komplex, který je složen z antigenu mezi dvěma protilátkami. Tento komplex může být detekován přidáním bezbarvého substrátu, který se zbarví za přítomnosti enzymu. Existuje mnoho různých typů substrátů, které se využívají pro ELISA testy. Nejběžnějšími jsou však 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, ortho-fenyldiamindihydrochloride nebo 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6- kyselina sulfonová]-diammoniová sůl [12].



Protilátky jsou využívány pro identifikaci mikroorganismů již řadu let. Tato detekce je založena na afinitní vazbě k povrchovým strukturám buňky. Hlavním problémem této metody jsou však samotné protilátky. Drahá je nejen jejich příprava, ale také purifikace. Opatrně se také musí zacházet při jejich skladování a manipulaci, jinak mohou ztratit své vazebné schopnosti [13]. Navíc, funkce protilátek je omezená na fyziologické prostředí [1].

Všechny výše zmíněné metody mají své nevýhody, které vedou k vyvíjení novějších a jednodušších metod pro detekci patogenů. Jednou z těchto nových metod je právě izolace mikroorganismů pomocí molekulově imprintovaných polymerů z komplexních vzorků.

Výhody i nevýhody metod, které se využívají pro detekci mikroorganismů, jsou shrnuty v tabulce 1.

**Tabulka 1:** Porovnání výhod/nevýhod metod detekce patogenů [4-6, 9, 13].

| Metoda       | Výhody                                      | Nevýhody   |
|--------------|---|--|
| Kultivační   | Jednoduchá a levná analýza                  | Časová náročnost                                     |
| MALDI TOF-MS | Rychlost, citlivost                         | Vysoká pořizovací cena, předpříprava vzorků          |
| PCR          | Citlivost, přesnost, bez kontaminace vzorků | Předpříprava vzorků, cena analýzy                    |
| ELISA        | Rychlost, citlivost, selektivita            | Nízká stabilita a vysoká cena používaných biomolekul |

## 2.2 Molekulově imprintované polymery (MIP)

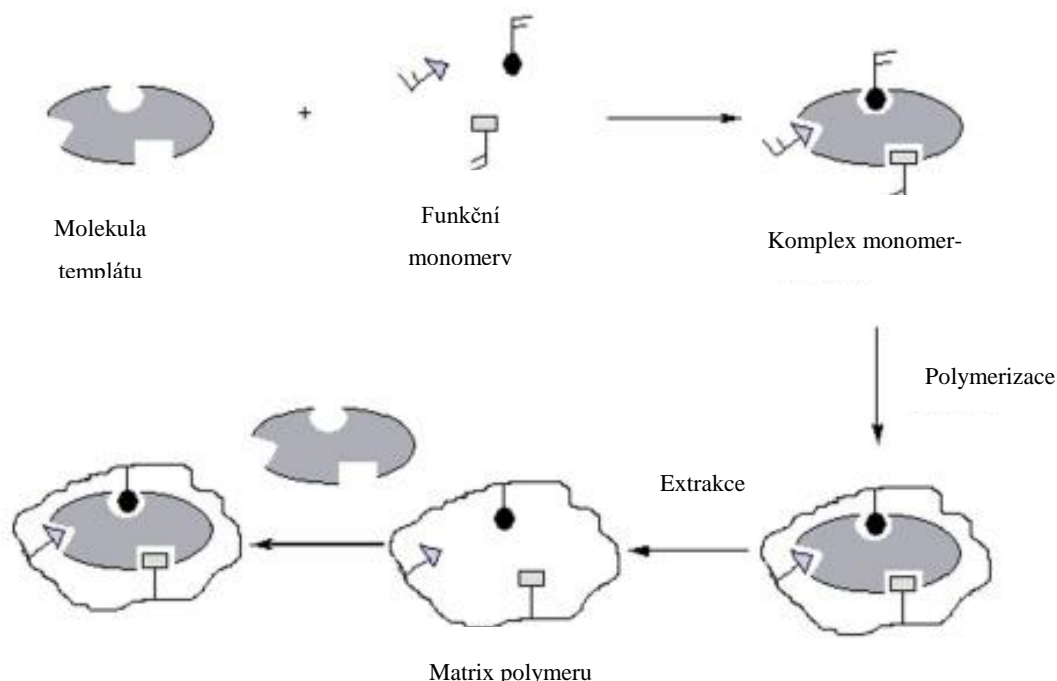
MIP jsou polymerní materiály, které jsou schopny napodobovat biomolekuly, jako jsou například protilátky, které se obvykle používají pro separaci a detekci [14]. Tato technologie umožňuje vytvářet specifická vazebná místa s vysokou selektivitou a afinitou pro širokou škálu látek od iontů až po větší struktury jako jsou viry nebo bakterie [15].

MIP mohou nalézt své uplatnění v separačních procesech, senzorech nebo mohou být využity jako transportéry léčiv [11, 16-19].

Tyto polymerní materiály jsou také přezdívané jako syntetické protilátky nebo enzymatické napodobeniny s předem danou vazebnou specifitou a afinitou vůči zvolenému analytu. Proces polymerace je složen z několika kroků (Obrázek 1 přehledně znázorňuje schéma přípravy MIP):

1. Proces je zahájen smísením templátu (imprintovaná molekula), funkčního monomeru, zesíťovacího činidla a iniciátoru v porogenním rozpouštědle, přičemž dochází ke tvorbě komplexů mezi templátem a jednotlivými složkami směsi
2. Následně dochází k zahájení polymerace působením například tepla, UV záření nebo oxidačního činidla

3. Po ukončení polymerační reakce je templát ze vzniklé polymerní matrice vymyt vhodným rozpouštědlem za vzniku kavit specifických pro imprintovanou molekulu
4. Takto připravené MIP mohou být použity pro selektivní izolaci analytu (otištěné složky) z komplexních vzorků [14, 20]



**Obrázek 1:** Schéma přípravy MIP [14].

Využití MIP zaujímá stále větší pozornost vzhledem k řadě jejich výhod, mezi které patří např.: nízké výrobní náklady, vysoká chemická i mechanická stabilita nebo vysoká selektivita. MIP mohou být také v porovnání s protilátkami používány při vyšších teplotách a tlacích (je možné je i sterilovat) [1]. Zároveň i jejich příprava a skladování je snazší. Je třeba ale brát také v potaz jejich nevýhody. Navržení nového systému, který by byl vhodný pro vybraný templát, vyžaduje řadu optimalizací, musí být nalezen vhodný funkční monomer a případně zesíťovací činidlo, optimalizován musí být i jejich poměr k templátu, polymerizační podmínky a vymývací krok [14]. Při vymývání může také doházet k poškození rozpoznávacích kavit. Byla již vyvinuta řada přístupů, které umožnili citlivou izolaci nízkomolekulárních látek za použití MIP. Na druhou stranu větší struktury jako jsou peptidy, proteiny nebo třeba mikroorganismy jsou stále ještě výzvou, zejména kvůli problémům spojeným s vymývacím krokem a pomalé kinetice při opětovném navazování [21].

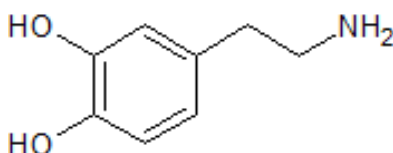
**Tabulka 2:** Porovnání výhod/nevýhod MIP a protilátek [14, 22].

| MIP                            |                                 | Protilátky           |   |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------------|---|
| Výhody                         | Nevýhody                        | Výhody               | Nevýhody                                    |
| Nízká cena                     | Dlouhá doba optimalizace metody | Nižší detekční limit | Vysoká cena protilátek a jejich přečištění  |
| Vysoká stabilita a selektivita |                                 | Citlivost            | Časová náročnost                            |
| Nenáročné na přípravu          |                                 | Selektivita          | Nerovnoměrná interakce látek s protilátkami |
| Možnost epitop imprintingu     |                                 |                      | Uchovávání a přeprava                       |

### 2.3 Funkční monomer (FM)

Existuje již celá řada FM. Volba správného FM, který bude interagovat s templátem, je jedním z klíčových faktorů při tvorbě MIP. Většina FM, polymerizuje za vzniku lineárního řetězce. Pro vytvoření polymerní sítě je nezbytné k nim ve většině případů přidat zesíťovací činidlo. Jedná se o molekulu, která disponuje dvěma dvojnými vazbami, prostřednictvím kterých je schopna provázat lineární řetězce polymerů a vytvořit tak trojrozměrnou síť. K odstartování polymerizačního kroku, je nezbytné přidat iniciátor reakce, který uvolňuje volné radikály a zahajuje polymerizační proces. Iniciační reakce může být zahájena například změnou teploty, působením UV záření, oxidačně-redukční reakcí apod. v závislosti na použitém iniciátoru. Mezi nejčastější FM, využívané k přípravě MIP, patří například trifluormethakrylová kyselina, 2- nebo 4- vinylpyridin, kyselina methakrylová nebo dopamin (DA) [23].

V této práci byl jako funkční monomer použit DA. Jedná se o látku, která patří do skupiny katecholaminů (struktura DA je znázorněna na obrázku 2). Podmínky potřebné k vytvoření vrstvy polydopaminu (PDA) jsou alkalické prostředí a přítomnost kyslíku. Velkou výhodou tohoto FM je i to, že jeho polymerizace vede k tvorbě trojrozměrné sítě a není třeba využívat zesíťovacích činidel. Vzniklý PDA je stabilní, ekologický a vhodný zejména proto, že obsahuje volné funkční skupiny, které umožňují interakci s templátem/analytem. Řadíme mezi ně především amino, fenylové a hydroxylové skupiny [23, 25].



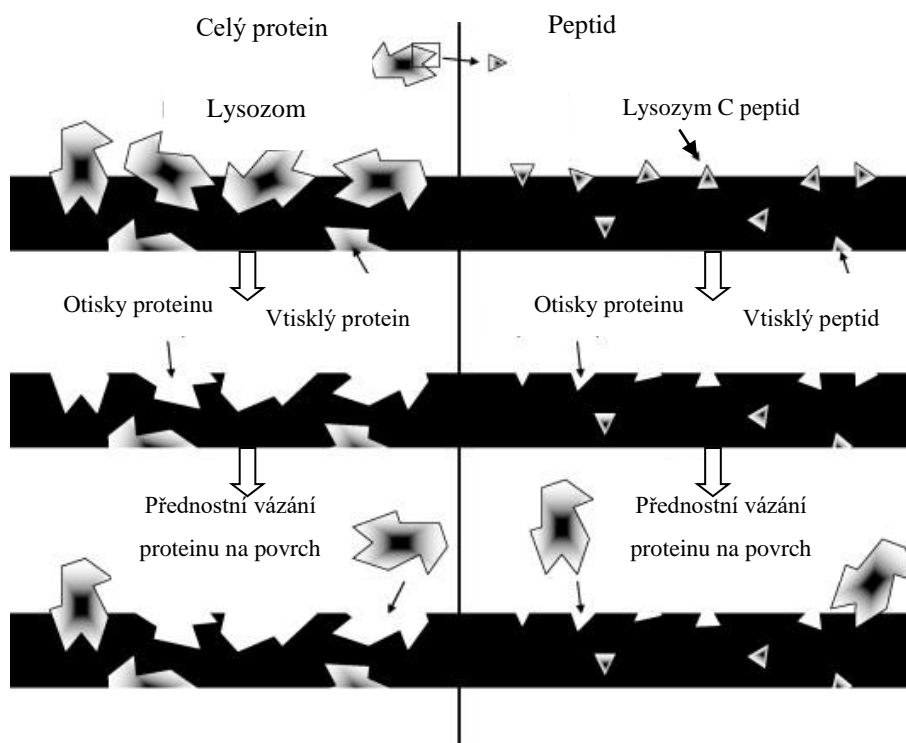
**Obrázek 2:** Struktura dopaminu.

### 2.3.1.1 Imprinting celých molekul vs. epitop imprinting

K nejčastěji využívaným metodám molekulového imprintingu patří imprinting celých molekul (struktur). U velkých templátů jako jsou např. proteiny nebo buňky však může docházet k problémům týkajících se konformační stability během polymerace. Navíc otisknutím velkých molekul vznikají velké kavity, což může vést k navazování menších polypeptidů a snížení selektivity. Hlavním problémem je však to, že velké molekuly/struktury mohou být vázány v polymeru příliš hluboko, což vede k obtížnému vymývání těchto molekul z MIP. K alternativním metodám molekulárního imprintingu patří přístup, ve kterém je jako templát použita pouze část analytu tzv. epitop imprinting [26].

Název epitop pochází z podobnosti interakce antigen-protilátka. Když se protilátka imunitního systému naváže na antigen, není potřeba, aby rozpoznala celou molekulu, stačí pouze její malá část. Tuto část nazýváme epitop [27]. Proces imprintingu celé molekuly a imprintingu epitopu je přehledně zobrazen na obrázku 3.

Epitopimprinting vykazuje vysokou selektivitu k templátu. Problémem však je, že otiskovaná část analytu (např. sekvence proteinu) nemusí být specifická pouze pro jeden analyt (např. jeden protein). Běžně se imprintují pouze lineární epitopy, lze tedy jako epitop využít například peptid o krátké sekvenci (3 aminokyseliny), sacharid apod. Tyto epitopy se však nacházejí v proteinu v 3D struktuře, což může sehrát významnou roli při molekulovém rozpoznávání [27, 28].



**Obrázek 3:** Porovnání imprintingu celé molekuly a epitop imprintingu, kde je otiskovaná pouze část molekuly (epitop) [27].

## 2.4 Počátky imprintingu mikroorganismů

Tato bakalářská práce je zaměřena na molekulový imprinting bakterie *Enterococcus faecalis*. Jelikož jsou bakteriální kontaminace velmi aktuálním tématem, je jejich stanovení a detekce v různých matricích v zájmu řady vědeckých oblastí (medicína, potravinářství, životní prostředí apod.).

Imprintingem bakterií se zabývali prof. Vulfson a jeho spolupracovníci, kteří zkoumali bakterie za pomoci litografie a zveřejnili první úspěšný pokus o živý buněčný imprinting. Pro své studia si jako templát zvolili bakterie *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*. Bakteriální buňky byly zachyceny na povrchu díky tendenci mikroorganismů hromadit se v interfázi mezi organickou a vodnou fází [29, 30].

Následně Redeker a kolektiv představil testy identifikace bakterií, které byly založeny na analýze šíření tepelných vln přes rozhraní a kombinovány s MIP. Výsledky ukázaly, že vyvinutý senzor byl schopen detekovat bakterie v moči a to i při koncentraci  $3 \cdot 10^4$  CFU·ml<sup>-1</sup> [31].

Na vývoj senzorů se zaměřil i výzkumný tým prof. Dulaye, který připravil biosenzor s vysokou citlivostí a selektivitou, založený na přípravě organosiloxanových polymerů, připravených otištěním bakterie *Escherichia coli* [32, 33].

## 2.5 Molekulově imprintované polymery na magnetických částicích

MIP je možné připravit na různých typech nosičů od sklíček [34], přes multititrační destičky [35] nebo elektrody [36] až po různé typy částic jako jsou například uhlíkové tyčinky, skleněné částice, kvantové tečky [37] nebo částice magnetické (MP). V případě, že je polymerní vrstva připravena na plošném nosiči, může docházet v důsledku malé plochy nosiče k nízké detekční citlivosti nebo k pomalému přenosu hmoty způsobené nerovnoměrnou tloušťkou polymerní vrstvy, což může vést k neúplnému odstranění templátu nebo nepřístupnosti připravených kavit pro analyt. Tyto problémy však mohou být vyřešeny zvolením nosiče v podobě částic. V této bakalářské práci byly jako vhodný nosič zvoleny MP. Tyto částice mají řadu atraktivních vlastností, mezi které patří například malá velikost (v řádu  $\mu\text{m}$ ), velký poměr povrchu k objemu a magnetické vlastnosti, které umožňují snadnou akumulaci částic použitím externího magnetického pole bez nutnosti centrifugace. Tyto vlastnosti usnadňují promývací krok a umožňují izolovat analyt z velkých objemů vzorků a což vede k mimořádně citlivé detekci [38].

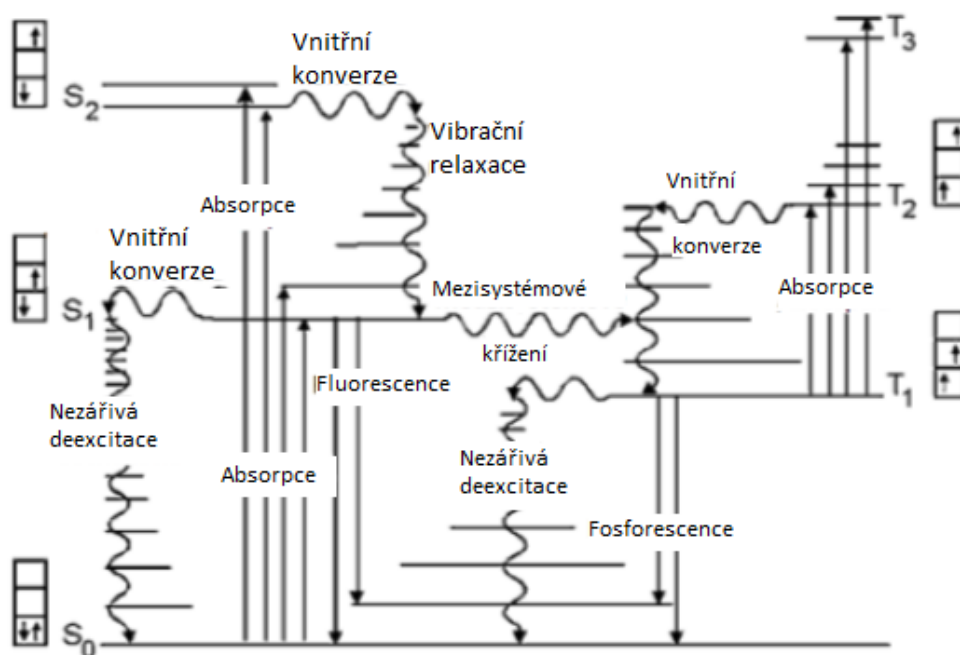
MP jsou komerčně dostupné již řadu let. Díky svým magnetickým vlastnostem a velkému specifickému povrchu jsou velmi často používány jako nosiče různých ligandů či bioaktivních látek [38]. Velmi často se objevují i práce, ve kterých byla na povrchu MP připravena vrstva MIP. Slibné aplikace MP-MIP se jeví například při určování aminokyselin a peptidů, pesticidů, drog, bakterií a mnoha dalších [22]. Tyto částice o rozměrech nano či mikrometrů obsahují ve svém jádře oxidy železa (magnetit, maghemit). Jedná se o tzv. super paramagnetické částice, což znamená, že je možné je pomocí magnetického pole velice snadno separovat z kapalné fáze. Po odstranění magnetického pole však částice svoje magnetické vlastnosti ztrácí a mohou být opět suspendovány do kapalné fáze [38, 39].

V porovnání s MIP připravenými na plošném nosiči mají MP-MIP vytvořené kavity specifické pro otisknutou molekulu situovány na svém povrchu, což umožňuje lepší odmývání templátu a dobrý přístup analytu ke kavitám. Metoda je tedy mnohem selektivnější a citlivější [22]. Jednou z nevýhod však je, že magnetické částice jsou sice účinnější, ale jejich cena je vyšší [39-41].

## 2.6 Fluorescenční mikroskopie

V předložené bakalářské práci byla pro detekci mikroorganismů izolovaných za použití MIP zvolena metoda fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční mikroskopie byla využita například při detekci cyklického guanosinmonofosfátu (c-GMP). Jedná se o látku, která má význam při různých onemocněních jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění nebo cukrovka [42]. Fluorescenční mikroskopie, jak název napovídá, využívá k detekci fluorescenci. Jedná se o typ luminiscence, která je spontánní emisí světla. Poté, co molekula absorbuje foton (světelná energie), získaná energie umožní excitaci elektronu molekuly ze základního stavu do vyšší energetické hladiny [43, 44].

Excitovaný elektron se následně vrací do základního energetického stavu. Tento děj je spojen s emisí světelné energie. Vzhledem k tomu, že se část energie spotřebovává vnitřními interakcemi, má emitovaný foton menší energii (delší vlnovou délku) než foton absorbovaný. Tato změna se nazývá Stokesův posun. Molekulární přechody vysvětlující tyto procesy jsou znázorněny v Jablonského diagramu (Obrázek 4).



**Obrázek 4:** Jablonského diagram [43].

Ve většině případů bývá analyt označen fluorescenční sondou, známou také jako fluorofor. V této práci byl pro fluorescenční značení použit propidium jodid, což je fluorescenční barvivo, které vstupuje pouze do buněk, které mají narušenou membránu, a proto slouží k značení mrtvých mikroorganismů [43-45]. Vzhledem k tomu, že dopamin, který byl použit

jako funkční monomer při přípravě MIP, vykazuje antibakteriální vlastnosti, bylo zvoleno právě toto barvivo, jako vhodné pro detekci.

Technika fluorescenční mikroskopie se postupně stala významnou součástí různých vědeckých oblastí, mezi které patří například biologie, biomedicína nebo vývoj materiálů. Je stále více využívána díky mnoha výhodám, mezi které patří citlivost a selektivita, kdy se nám barvivo naváže pouze na zvolenou analyzovanou část (např. jádro buňky). Aplikace řady fluorochromů umožňuje identifikaci buněk a sub-mikroskopických buněčných složek s vysokým stupněm specifity uprostřed nefluorescenčního materiálu [44-46].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Popis experimentu

Experimentální část se zabývá optimalizací a přípravou molekulově imprintovaných (MIP) a neimprintovaných (NIP) polymerů na dvou nosičích: destičce a MP. NIP je molekulově neimprintovaný polymer, který nám slouží jako indikátor nespecifických interakcí. Připravuje se na stejném principu jako MIP, ale bez přítomnosti templátu. Je využíván jako ukazatel, který nám říká, zda se analyt neváže i mimo kavitu vytvořené otištěním. Cílem bylo připravit polymery, které budou specifické pro zvolený druh patogenu. Jako otiskovaný templát byla zvolena bakterie *Enterococcus faecalis* (EF). Pro zjištění selektivity připravených MIP, byla jako kompetitor reakce použita bakterie *Staphylococcus aureus* (SA). MIP a NIP připravené v destičce byly použity pro optimalizaci podmínek měření (promývací roztok, koncentrace FM a adsorpční kinetika), dále pak byla proměřena kalibrační řada a reálný vzorek (polotučné kravské mléko). Kalibrační řada byla též proměřena na MIP a NIP připravených na MP.



**Obrázek 5:** Schéma znázorňující princip experimentu. K připraveným MIP-MP je přidán vzorek obsahující bakterie. Výsledkem je izolace bakterií z vzorku.

#### 3.2 Materiály

Dopamin hydrochlorid, TRIZMA báze  $\geq 99,8 \%$ , Dodecylsírán sodný  $\geq 99 \%$ , Hydroxid sodný  $\geq 97 \%$  a propidium jodid byly zakoupeny od společnosti Sigma aldrich (USA). Kyselina octová  $99,8 \%$  pochází od firmy Penta (CZ) a magnetické částice Dynabeads™ MyOne™ Silane Thermo Fisher Scientific (USA). Mléko polotučné bylo vyrobeno v mlékárně Kunín (CZ).

#### 3.3 Přístrojové vybavení

Fluorescenční mikroskop Olympus IX71

Centrifuga 5417 R

Aautomatický rotátor Multi Bio RS-24

Analytické váhy Mettler Toledo XSR



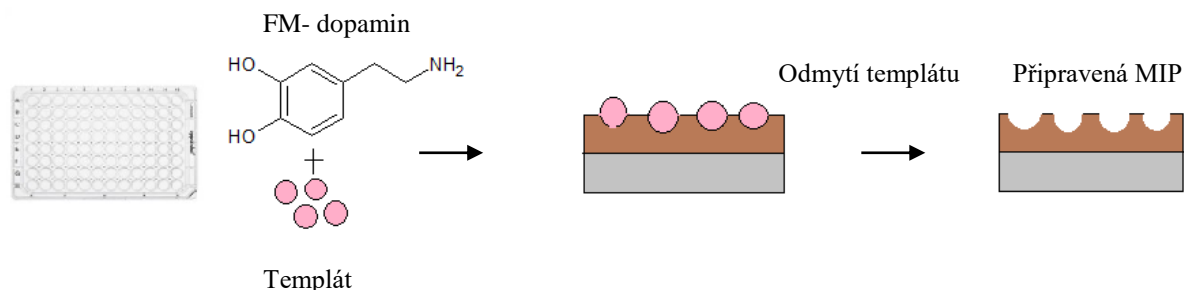
### 3.4 Metody

#### 3.4.1 Příprava bakterií

Bakterie *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 a *Staphylococcus aureus* NCTC 8511 (Česká sbírka mikroorganismů, Brno, Česká republika) byly kultivovány v živném médiu Muller Hinton (MHB; UK) přes noc při 37 °C a 150 rpm. Koncentrace bakteriálního roztoku byla stanovena optickou hustotou při 600 nm a pomocí MHB byla kultura upravena na koncentraci  $10^6$  CFU · ml<sup>-1</sup>. Bakterie byly centrifugovány 10 minut při 8000 rpm a teplotě 22 °C. Poté byl odebrán supernatant a pelet byl rozpuštěn v roztoku 20 mM TRIS o pH 8,5.

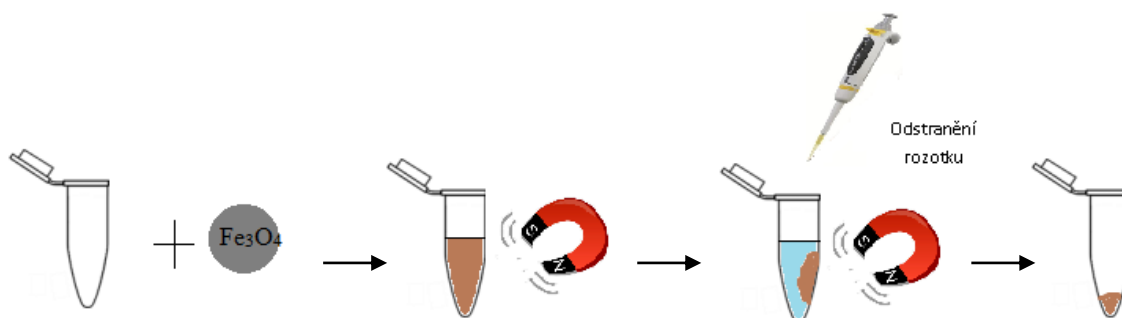
#### 3.4.2 Příprava MIP a NIP v destičce

Nejprve byla destička promyta 75 % ethanolem a poté vysušena dusíkem. Pro přípravu MIP bylo do jamek multititrační destičky smíšeno 25 µl bakterií suspendovaných v 20 mM TRIS pH 8,5 ( $1 \cdot 10^7$  CFU · ml<sup>-1</sup>) a 25 µl dopaminu (koncentrace 5 mg · ml<sup>-1</sup>) suspendovaného v 20 mM TRIS pH 8,5. Pro přípravu NIP bylo použito pouze 25 µl bakterie nahrazeno 25 µl mM TRIS pH 8,5. Polymerní reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě (16 hodin). Po ukončení polymerizačního kroku byly jamky jednou promyty zvoleným promývacím roztokem (10 % kyselina octová a 2 % SDS v poměru 1:1) a poté třikrát pufrem - TRIS (pH 8,5, 20 mM), aby došlo k dostatečnému vymytí navázaného templátu a vzniku požadovaných kavit. Na takto připravené MIP a NIP bylo navazováno 50 µl vzorku. Navazování probíhalo po dobu 20 minut. Poté byl roztok vzorku odebrán a jamky byly obarveny 50 µl fluorescenčního barviva - propidium jodid. Příprava MIP a NIP na magnetických částicích (MIP-MP).



**Obrázek 6:** Schéma přípravy MIP a NIP v destičce.

MIP-MP byly připraveny podle metody popsané Yangem a spolupracovníky s mírnou modifikací [47]. 50 µl magnetických částic ( $40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) bylo třikrát promyto 20 mM TRIS (pH 8,5). Následně bylo k promýtným MP přidáno 600 µl *Staphylococcus aureus* ( $1, 10^7$  CFU · ml<sup>-1</sup>) suspendovaných ve 20 mM TRIS (pH 8,5). Pro přípravu NIP, který se používá jako kontrola, bylo do promýtných MP přidáno pouze 600 µl 20 mM TRIS (pH 8,5). Tato připravené směsi byly míchány po dobu 1 hodiny, dokud nebyly MP dobře suspendovány. Potom bylo přidáno 100 µl dopaminu ( $17,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) suspendovaného ve 20 mM TRIS (pH 8,5) a reakce pokračovala přes noc při laboratorní teplotě (16 hod). Po ukončení polymerizačního kroku je templát odmyt třikrát 200 µl roztoku obsahujícího směs 5 % kyseliny octové a 1 % SDS a pak jednou destilovanou vodou. Před měřením byly MIP i NIP, připravené na MP, obarveny propidium jodidem, kdy se na sklíčko napipetovalo 9 µl MIP nebo NIP a 1 µl fluorescenčního barviva.



**Obrázek 7:** Schéma promývání magnetických částic.

### 3.4.3 Detekce pomocí fluorescenční mikroskopie

Pro zobrazování MIP/NIP byl použit invertovaný fluorescenční mikroskop Olympus IX71. Použitým objektivem byl LUCPLFLN 20 X PH. Celkové zvětšení bylo 200 x. Detektorem emitovaného světla byl Hamamatsu CCD ORCA-HR (C4742-95-12HR) s pixely  $1600 \times 1200$ , doba expozice byla 4 s. Filtr byl TX Red (např. 545 nm, em 610 nm, dichroické zrcadlo 600 nm). Fotografie MIP/NIP byly vyhodnoceny pomocí softwaru BRUKER Molecular Imaging, který umožňuje sečíst intenzity všech zářivých bodů na snímku.



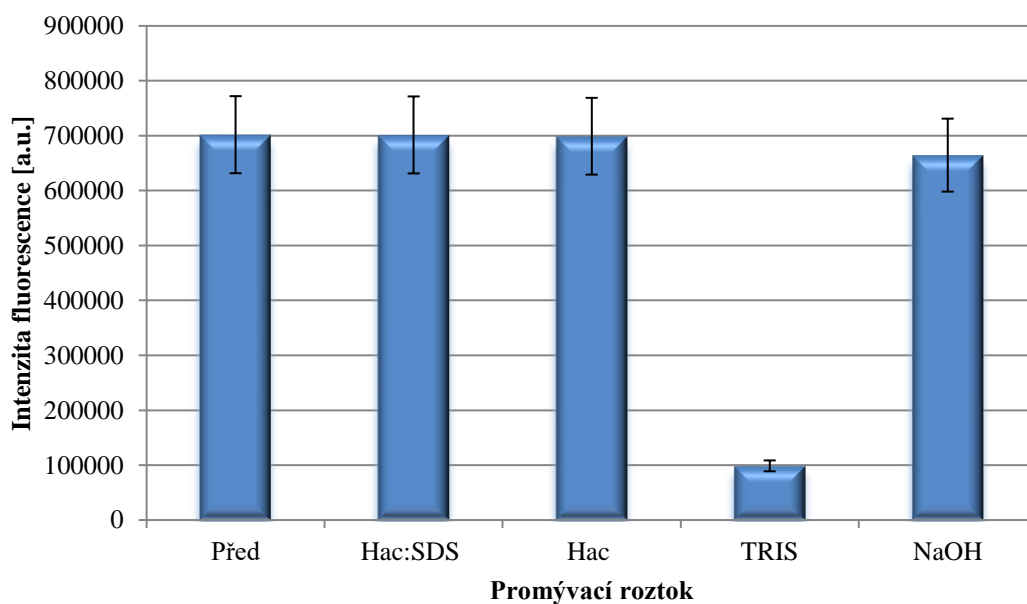
**Obrázek 8:** Fluorescenční mikroskop Olympus IX7 [48].

## 4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace promývacího roztoku

Mezi klíčové kroky v procesu přípravy MIP patří odstranění molekuly. templátu. Při odstranění templátu z polymerní matrice však může dojít k poškození vazebných míst, které mohou změnit svoji strukturu v důsledku bobtnání polymeru nebo může v procesu vymytí templátu dojít k jejich kolapsu apod. Právě proto je výběr promývacího roztoku velmi důležitý.

Pro vymývání templátu z polymerní sítě, byly testovány 4 promývací roztoky. Jednalo se o roztok 1) 10 % kyseliny octové, 2) směs 10 % kyseliny octové a 2 % SDS (v poměru 1:1), 3) 0,2 M NaOH a 4) TRIS (20 mM, pH 8,5). MIP i NIP byly vždy promyty jedním z roztoků a poté třikrát TRIS pufrem (20 mM, pH 8,5), s výjimkou posledního promývání. To bylo provedeno pouze třikrát TRIS (20 mM, pH 8,5). Poté byly tyto jamky obarveny 50  $\mu$ l fluorescenčního barviva a zobrazeny pomocí fluorescenčního mikroskopu. Jedna jamka byla ponechána nepromyta, pouze obarvena, aby bylo možno porovnat míru vymytí templátu. Naměřená data jsou zaznamenána v grafu 1.

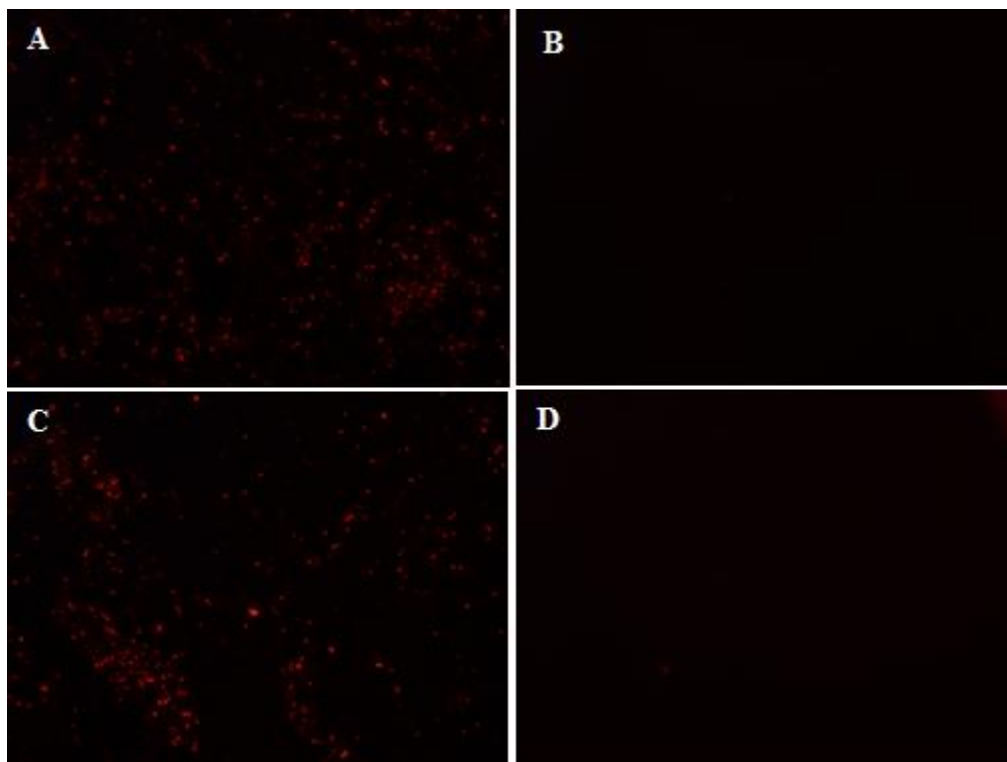


**Graf 1:** Optimalizace roztoku, kterým byl vymýván templát.

Z grafu 1 je patrné, že nejlépe vymývaly roztoky 10 % kyseliny octové a směsi 10 % kyseliny octové a 2 % SDS. U 10 % kyseliny octové došlo k vymytí 99,60 % a u směsi kyseliny octové a SDS 99,93 %. V případě TRIS pufru bylo vymyto pouze 14,07 % a v případě NaOH 94,69 %. V dalším kroku bylo nutné zjistit, jestli použité rozpouštědlo nezpůsobilo poškození vzniklých selektivních kavit. Proto bylo nutné vyzkoušet, na které připravené MIP se bude analyt lépe navazovat. Z tohoto experimentu bylo zjištěno, že u samotné 10 % kyseliny octové a NaOH byl při opětovném navázání analytu detekován pouze nízký signál. Důvodem pravděpodobně je, že použitím kyseliny či báze došlo k poškození vzniklých kavit. U směsi

kyseliny octové a SDS došlo k navázání analytu. Proto byla jako promývací roztok zvolena směs 10 % kyseliny octové a 2 % SDS v poměru 1:1.

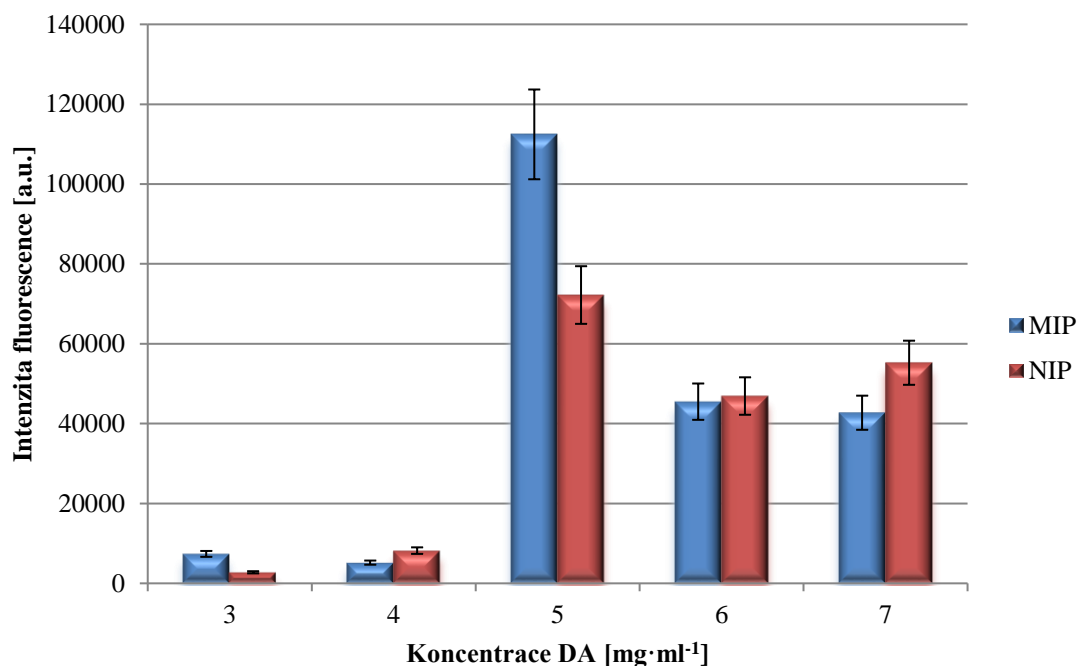
Vyhodnocení mikroskopových snímků probíhalo za využití programu Bruker MI software. Na obrázku 9 jsou snímky MIP před a po vymytí za použití směsi 10% HAc a 2 % SDS v poměru 1:1 a 10 % HAc. Ze snímků je patrné, že za použití těchto podmínek došlo k odstranění téměř veškerého templátu.



**Obrázek 9:** A) MIP před vymytím templátu (10 % HAc). B) MIP po vymytí templátu (10 % HAc) C) MIP před vymytím templátu (směs 2 % SDS a 10 % HAc) D) MIP po vymytí templátu (směs 2 % SDS a 10 % HAc).

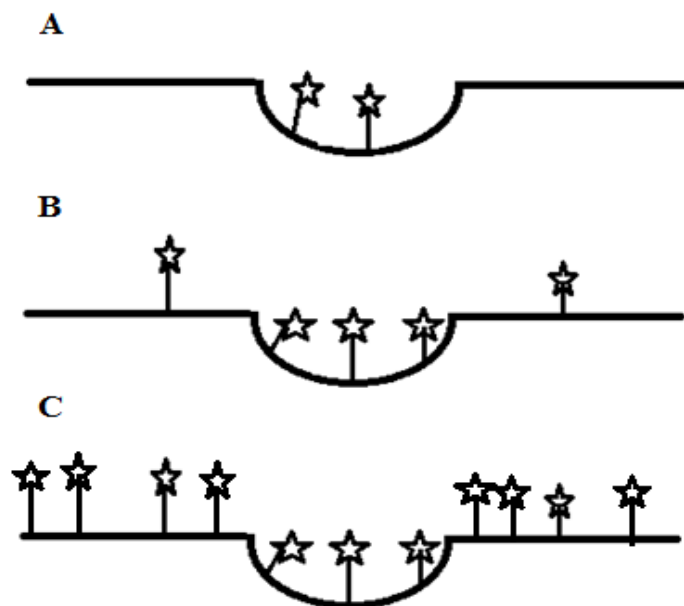
#### 4.2 Optimalizace koncentrace dopaminu

Koncentrace funkčního monomeru (FM) má výrazný vliv na citlivost připravených imprintovaných polymerů. Bylo tedy zapotřebí optimalizovat koncentraci FM, při které by docházelo k co nejvyššímu navazování analytu na MIP a zároveň nedocházelo k nespecifickým interakcím mimo kavity. Připravili jsme si MIP i NIP s 5 různými koncentracemi FM v rozmezí 3-7 mg·ml<sup>-1</sup>. Na takto připravené polymery byl posléze navázán analyt o koncentraci 10<sup>6</sup> CFU·ml<sup>-1</sup>. Naměřená data jsou zaznamenána v grafu 2.



**Graf 2:** Optimalizace koncentrace dopaminu

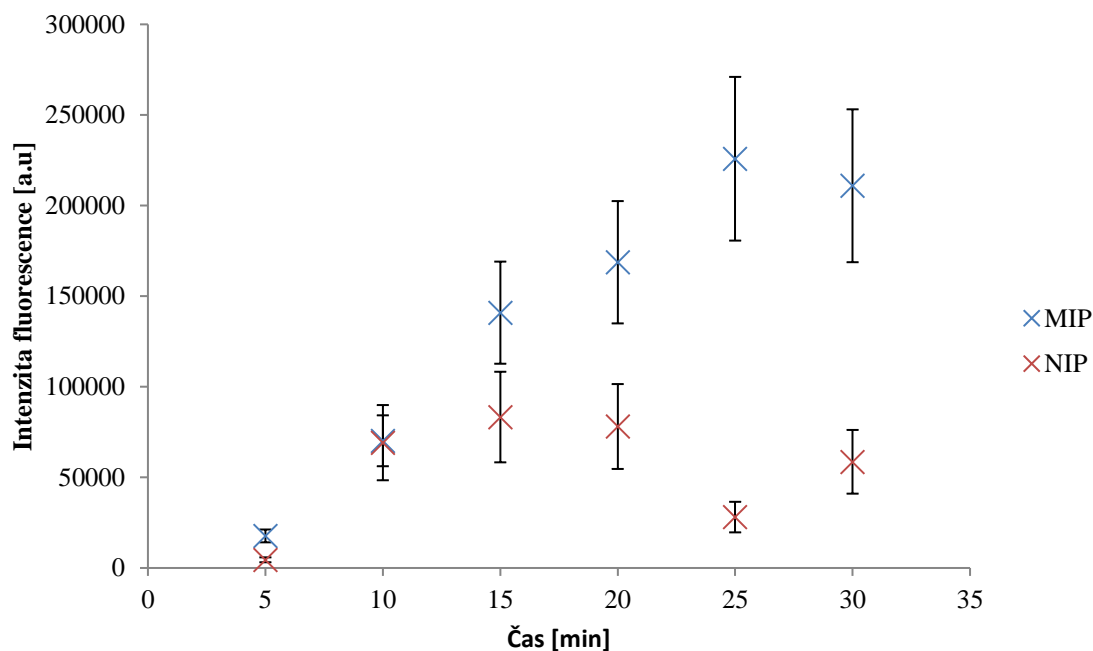
Při příliš nízkých koncentracích FM – dopaminu bylo ve vzniklých kavitách nedostatečné množství funkčních skupin. Proto se templát vázal jen v malém množství, což je patrné u koncentrace 3 mg·ml<sup>-1</sup> a 4 mg·ml<sup>-1</sup> FM. Naopak při příliš vysokých koncentracích byly funkční skupiny v nadbytku i mimo oblast kavit, což způsobilo to, že se templát vázal nespecificky i mimo vytvořené kavity a docházelo tak nárůstu intenzity fluorescence u NIP. Tento případ nastal u koncentrací 6 mg·ml<sup>-1</sup> a 7 mg·ml<sup>-1</sup>. jako optimální koncentrace FM bylo zvoleno 5 mg·ml<sup>-1</sup>. V tomto případě docházelo ke specifické izolaci analytu a pouze k minimálním nespecifickým interakcím. Pro lepší pochopení této problematiky je vliv koncentrace na vytvořený imprintovaný polymer schematicky znázorněn na obrázku 10.



**Obrázek 10:** A) Znázornění nízké koncentrace dopaminu, kdy je v kavitách malý počet funkčních skupin. Důsledkem je pak malá vazba analytu na MIP. B) Představuje ideální koncentraci, při které je v kavitách dostatečné množství funkčních skupin dopaminu pro navázání templátu. Funkčních skupin mimo kavitu je nízký počet, proto jsou nespecifické interakce zanedbatelné. C) Při příliš vysokých koncentracích dopaminu dochází ke zvýšení nespecifických interakcí. Znázorňuje to vysoký počet funkčních skupin dopaminu mimo vytvořené kavity.

### 4.3 Optimalizace adsorpční kinetiky

Pro vyhodnocení nejvhodnější doby navazování analytu na imprintovaný polymer byl proveden experiment, který byl založen na ponechání MIP a NIP v kontaktu s roztokem bakterií o koncentraci  $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$  po dobu 5 až 30 minut. Po uplynutí stanovené doby byl roztok bakterií z polymeru odstraněn a nevázané bakterie a kontaminanty byly vymyty destilovanou vodou. Navázané bakterie byly obarveny fluorescenčním barvivem a detekovány pomocí fluorescenční mikroskopie. Výsledky měření jsou zaznamenány v grafu 3.



**Graf 3:** Optimalizace doby, po kterou byl analyt navazován.

Z dat v grafu 3 je patrné, že fluorescenční signál bakterií významně vzrůstal s rostoucí dobou akumulace analytu a po 20 minutách systém téměř dosahuje rovnováhy. V tomto čase je polymer pravděpodobně již nasycen analytem, protože další zvýšení doby akumulace nevede ke zvýšení signálu bakterií. Za optimální dobu nezbytnou pro nasycení MIP analytem, bylo zvoleno 20 minut. Z naměřených dat také vyplývá, že doba působení analytu nijak výrazně neovlivňuje interakci s NIP.

#### 4.4 Výběr vhodného nosiče

Citlivost vyvíjené metody je také závislá na zvoleném nosiči polymerní sítě. Byly vyzkoušeny dva různé typy nosičů, u kterých byly zaznamenány jejich výhody i nevýhody. Jedním z nosičů byla mikrotitrační destička a druhým magnetické částice.

**Destička:** Ačkoliv byla příprava MIP i NIP na destičce úspěšná, bylo zaznamenáno několik problémů. Hlavním problémem je, že je tahle metoda omezena malým objemem destičky. Čili prostor pro tvorbu polymeru i jeho promývání je omezen a k izolaci bakterií může docházet jen z malých objemů. Vzhledem k menšímu povrchu i objemu je tedy metoda méně citlivá. Nevýhodou je také zaoblený tvar dna jamek. Při pořizování snímků z fluorescenčního mikroskopu se kvůli ohybu nedá snímek dostatečně zaostřit, což působí problémy při vyhodnocování dat v programu Bruker MI software.

**Magnetické částice:** Stejně jako u destičky proběhla příprava MIP a NIP na MP úspěšně. Oproti destičce poskytují MIP-MP mnohem větší povrch, takže dochází k izolaci výrazně většího množství analytu. Kavity jsou navíc umístěny na povrchu částice, čímž je zajištěn lepší přístup analytu ke specifickým otiskům. Pracuje se zde také s většími objemy, což umožní citlivější detekci, než v předchozím případě. MIP-MP si také zachovávají magnetické vlastnosti, díky čemuž se analyt z komplexních vzorků odstraňuje mnohem selektivněji a

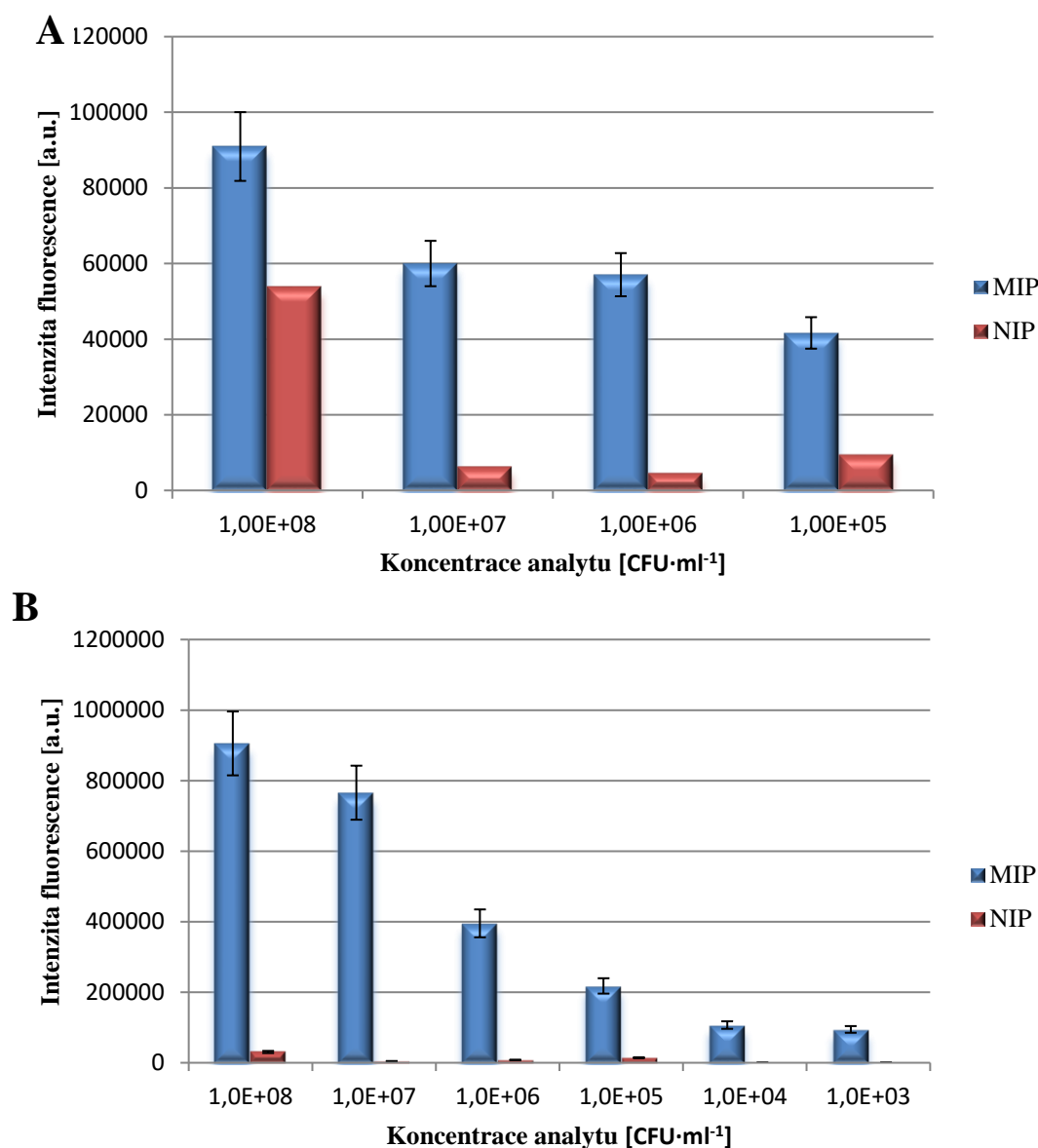
rychleji. Pro přípravu těchto polymerů se využívají komerční MP, což podstatně zvýší cenu metody. Měření na fluorescenčním mikroskopu probíhá na sklíčku, nesetkáváme se tedy s problémem zaoblených jamek.

Pro oba nosiče byla připravena kalibrační křivka.

U kalibrační řady připravené v destičce byly použity koncentrace v rozmezí  $10^7$ - $10^4$  CFU·ml<sup>-1</sup> bakterií. Z naměřených dat zaznamenaných v grafu 4A lze vyvodit, že MIP váží ve srovnání s NIP přibližně 7x více bakterií. Zřejmé je také to, že s rostoucí počáteční koncentrací bakterií dochází i k nárůstu detekovaného fluorescenčního signálu způsobeného selektivní vazbou bakterií na MIP. Problémem však je, že při použití příliš vysokých počátečních koncentrací bakterie dochází i k nárůstu nespecifických interakcí na NIP.

U kalibrační řady měřené na magnetických částicích byly použity koncentrace v rozmezí  $10^7$ - $10^2$  CFU·ml<sup>-1</sup>. Naměřená data jsou zaznamenána v grafu 4B. V tomto případě se analyt na MIP váže ve srovnání s NIP přibližně 66x více. S rostoucí počáteční koncentrací bakterií opět dochází i k nárůstu detekovaného fluorescenčního signálu způsobeného selektivní vazbou bakterií na MIP. Výhodou ale je, že při použití vysokých počátečních koncentrací bakterie nedochází k výraznému nárůstu nespecifických interakcí na NIP. Metoda umožňuje detekci bakterií v lineárním rozsahu  $1 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^2$  CFU·ml<sup>-1</sup>. V porovnání s daty získanými na destičce jsou magnetické částice schopny detekovat 10x větší odezvu.



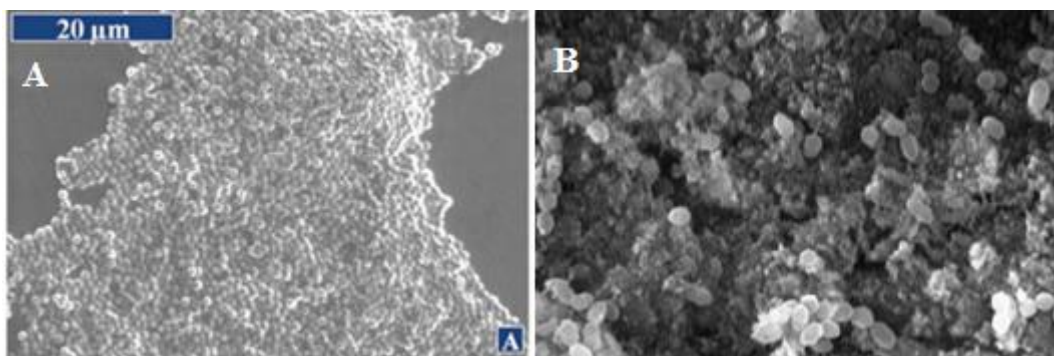


**Graf 4:** A) Kalibrační řada proměřena v destičce B) Kalibrační řada proměřena na MP.

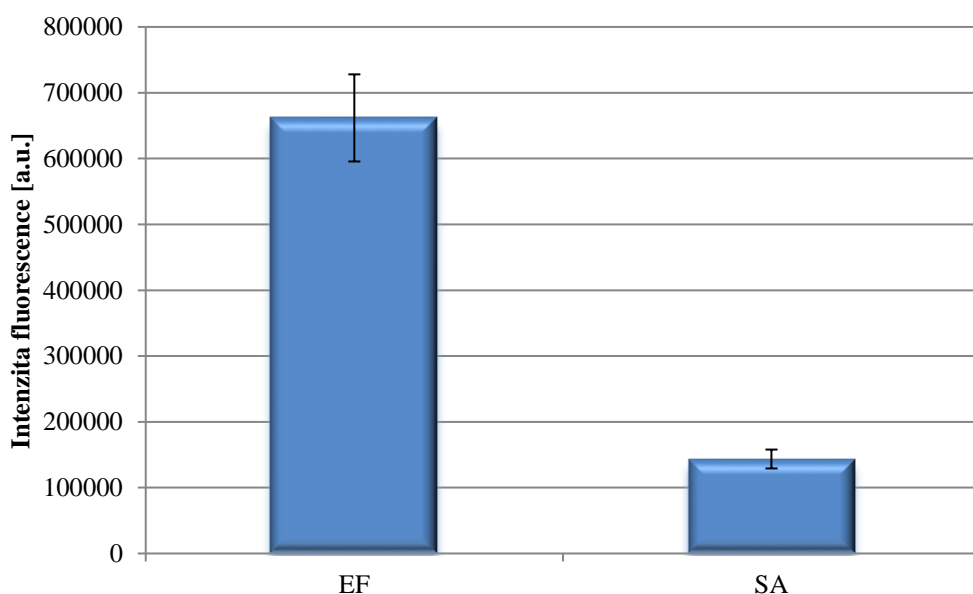
#### 4.5 Ověření vazebných vlastností- selektivita

Velmi důležité bylo ověřit selektivitu připravených imprintovaných polymerů. Jednalo se o kontrolu toho, zda se na vytvořené kavity nenaváže i bakterie, která má podobné vlastnosti a tvar jako bakterii sloužící jako templát – *Enterococcus faecalis*. Jako kompetitor byla použita bakterie *Staphylococcus aureus*. Jak můžeme porovnat (viz Obrázek 11), obě bakterie mají podobnou velikost (EF 0,6-2,5  $\mu\text{m}$  a SA 0,7-0,9  $\mu\text{m}$ ) a tvar. Také jsou obě gram-pozitivní a patří mezi koky. Cílem je tedy ověřit, zda se SA nenaváže na vytvořené kavity pro EF, což by mohlo být možné vzhledem k jejich podobným vlastnostem.

Nejprve byly připraveny MIP a NIP otisknutím bakterie EF. Templát byl odmyt a jako vzorek byl navazován kompetitor SA o koncentraci  $10^6$  CFU·ml<sup>-1</sup>.



**Obrázek 11:** Porovnání bakterie SA (A) a bakterie EF (B) [49, 50].



**Graf 5:** Ověření selektivity navazovaného patogenu (templátu).

Výsledek prokázal, že se SA navazoval na kavity vytvořené našim templátem asi 4x méně než EF. Tímto experimentem byla potvrzena selektivita vytvořených imprintovaných polymerů.

#### 4.6 Analýza reálného vzorku

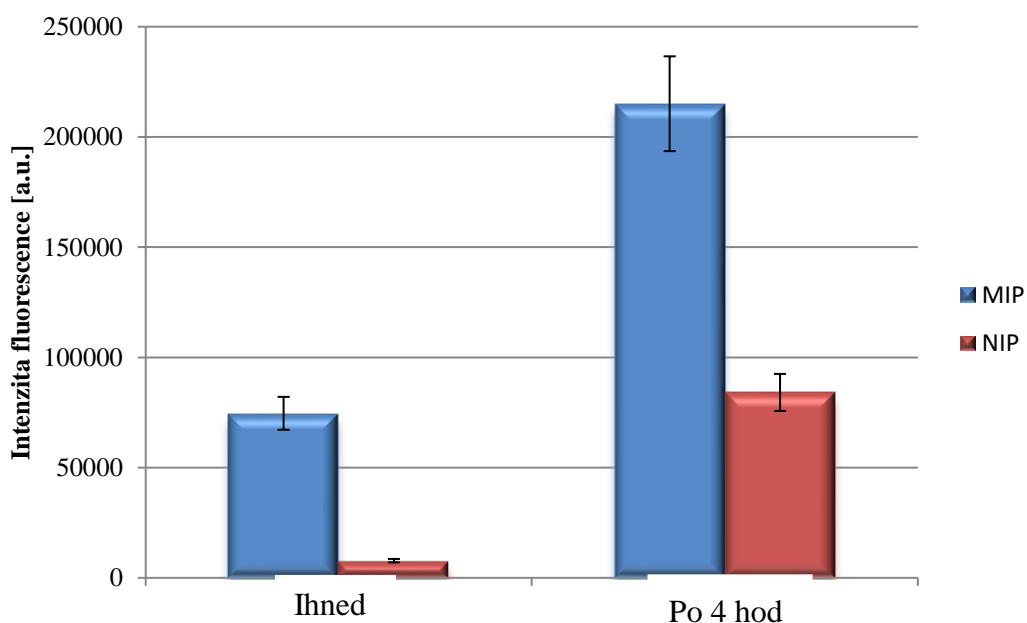
Se stále častějšími případy mikrobiální kontaminace potravin i vody je nutné kontrolovat přítomnost mikroorganismů. Tato práce je tedy zaměřena na bakterie, které mohou být kontaminanty potravin a způsobovat závažné poškození zdraví. Jako reálný vzorek byl použit vzorek mléka, ve kterém se obě bakterie mohou přirozeně vyskytnout.

EF, která byla použita jako templát MIP je gram-pozitivní bakterie, která je velmi častou příčinou infekcí. V současné době je problematická její vzrůstající rezistence vůči antibiotikům, jako je vancomycin, gentamicinu, kombinaci aminoglykosidů a ampicilinu [50, 51]. Tato bakterie se často používá jako indikátor fekálních kontaminací. Častým místem výskytu jsou těla skotu, do kterých se dostává ve výkalech pozřených spolu s potravou. Z organismu krav může dojít k sekreci bakterie do mléka a následné kontaminaci z něj vyráběných potravin.

*Enterococci* získali pozornost v průběhu několika desetiletí jako velmi častá příčina zánětů operovaných ran a močových [51].

*Staphylococcus aureus*, který byl použit jako kompetitor, je také gram-pozitivní, fakultativně anaerobní bakterie. Vytváří hroznovité kultury, které můžeme vidět na obrázku 11. Jedná se o významného kontaminanta potravin, který produkuje mnoho toxinů (enterotoxiny) [50, 51]. SA je odolný vůči různým druhům antibiotik (metcilinu) a bývá příčinou těžko léčitelných infekčních onemocnění u člověka [52, 53].

Do vzorku mléka byla uměle přidána bakterie, která měla výslednou koncentraci  $10^4$  CFU·ml<sup>-1</sup>. Tento vzorek byl navázán na MIP a NIP, které byly připraveny podle optimalizovaného postupu. Přidavek bakterie byl proveden dvěma způsoby. U jednoho vzorku byly bakterie přidány do mléka 4 hodiny před jeho navazováním na polymer, zatímco u druhého byl vzorek přidán těsně před navazováním. Cílem bylo zjistit, zda se patogen izoluje z reálného vzorku a porovnat, jestli delší doba zda má delší kultivace bakterií ve vzorku vliv na množství navázaného analytu.



**Graf 6:** Porovnání doby přidavku bakterií do vzorku. V prvním případě byl vzorek přidán 4 hodiny před měřením, zatímco druhý vzorek těsně před měřením.

V grafu 6 můžeme vidět, že izolace bakterií ze vzorku proběhla v obou případech. U vzorku, do kterého byly bakterie přidány těsně před navazováním, však došlo k vazbě asi 3x menšího množství analytu než v druhém případě. Na úkor vyšší intenzity fluorescence u MIP však došlo také k nárůstu u NIP. Vlivem delší doby zřejmě došlo k navýšení koncentrace bakterií v roztoku a tím i k nárůstu i nespecifických interakcí.

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla pospána důležitost problematiky detekce patogenů. Byly uvedeny základní informace o metodách, kterými lze v současnosti mikroorganismy detekovat a dále shrnuty jejich výhody a nevýhody. Obsahuje též popis metody molekulově imprintovaných polymerů, která je hlavním bodem této práce.

Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na přípravu a optimalizaci MIP a NIP, kde jako otiskovaný templát byla použita bakterie EA. Byla optimalizována koncentrace funkčního monomeru – dopaminu, která byla důležitá pro tvorbu polymerní sítě. Dále pak roztok, který byl používán pro vymývání templátu z polymeru. Vyzkoušeny byly 4 různé roztoky: 10 % kyselina octová s 2 % SDS (v poměru 1:1), 10 % kyselin octová, 0,2 M NaOH a TRIS pufr (pH 8,5, 20 mM). Proměřena byla také adsorpční kinetika pro zjištění vhodné doby navazování. Po optimalizaci těchto podmínek byla metoda MIP použita pro proměření kalibrační řady a reálného vzorku. Důležitým bodem bylo také prokázání selektivity připravených MIP. K tomuto účelu bylo využito druhé bakterie, která sloužila jako kompetitor. Svými vlastnostmi se EF nejvíce podobala bakterie SA.

Ze 4 vyzkoušených promývacích roztoků dosahovala nejlepších výsledků 10 % HAc a 2 % DS a samotná 10 % kyselina octová, kdy směs vymyla téměř všechny templát (99,93 %) stejně jako kyselina octová (99,60 %). Po zkušebním navázání bylo však zjištěno, že odezva u 10 % kyseliny octové byla výrazně nižší než u směsi. Důvodem je nejspíše poničení vzniklých kavit. Jako promývací roztok byla tedy zvolena směs 10 % HAc a 2 % SDS v poměru 1:1.

Z naměřených dat bylo patrné, že nejvhodnější koncentrací DA pro tvorbu polymerní sítě byla koncentrace 5 mg·ml<sup>-1</sup>. V kavitách nebylo nadměrné množství vazebných skupin DA, které by bránily navázání analytu na MIP. Množství nespecifických interakcí bylo též nízké. Proto byla pro přípravu MIP a NIP zvolena právě tato koncentrace.

U optimalizace doby nejvhodnější doby navázání bylo zvoleno 20 minut, kdy nárůst intenzity signálu po tomto čase zůstává relativně v rovnováze. Systém je nasycen polymerem a analyt se už dále nenavazuje.

Kalibrační řada byla proměřena jak na destičce, tak i na MP. U obou nosičů docházelo s rostoucí koncentrací analytu k růstu intenzity fluorescence na MIP. Pokud však byla zvolena příliš vysoká koncentrace analytu, docházelo též k nárůstu intenzity fluorescence na NIP vlivem nespecifických interakcí. U příliš nízkých koncentrací se zase navázalo příliš malé množství analytu. Proto byla při ostatních měřeních využívána hlavně koncentrace 10<sup>6</sup> CFU·ml<sup>-1</sup>.

Pro ověření selektivity byla jako kompetitor k EF zvolena bakterie SA, protože tvar i velikost jsou velmi podobné a jedná se též o koka a G<sup>+</sup> bakterii. Výsledkem byla cca 4x vyšší návaznost EF než SA.

Dva vzorky mléka, obsahující bakterie byl navázán na MIP a NIP. Výsledkem byla izolace bakterií ze vzorku. Prodloužením doby přítomnosti bakterie ve vzorku se nám výsledná intenzita fluorescence zvýšila.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MIP – molekulově imprintované polymery

NIP – molekulově neimprintované polymery

DA – dopamin

PDA – polydopamin

AMK – aminokyselina

CFU·ml<sup>-1</sup> – jednotky tvořící kolonie na jeden mililitr

MP – magnetické částice

MIP-MP – magnetické molekulově imprintované polymery

PI – propidium jodid

EF – *Enterococcus faecalis*

SA – *Staphylococcus aureus*

SDS – dodecylsírán sodný

TRIS – Trisma-báze

## 7 ZDROJE

- [1] IDIL, Neslihan a Bo MATTIASSON. *Imprinting of Microorganisms for Biosensor Applications. Sensors [online]*. 2017, **17**(4), 708- [cit. 2018-05-03].
- [2] LAZCKA, Olivier, F. Javier Del CAMPO a F. Xavier MUÑOZ, 2007. *Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Biosensors and Bioelectronics [online]*. **22**(7), 1205-1217 [cit. 2018-05-04].
- [3] LEONI, E., Legnani, P.P., 2001. *J. Appl. Microbiol.* 90 (1), 27–33
- [4] SINGHAL, Neelja, Manish KUMAR, Pawan K. KANAUIA a Jugsharan S. VIRDI. *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology [online]*. 2015, **6** [cit. 2019-05-10].
- [5] MAIER, Thomas, Stefan KLEPEL, Uwe RENNER a Markus KOSTRZEWA. *Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. Nature Methods[online]*. 2006, **3**(4), i-ii [cit. 2019-05-10].
- [6] FENSELAU, Catherine a Plamen A. DEMIREV. *Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews[online]*. 2001, **20**(4), 157-171 [cit. 2019-05-15].
- [7] RODRIGUEZ-L'azaro, D., D. A. M., HERREWEGH, A., Pla, M., COOK, N., Ikononopoulos, J., 2005. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 93–104.
- [8] TOURON, A., B.T., PAWLAK, B., PETIT, F., 2005. *Res. Microbiol.* 156, 541–553.
- [9] AHMED, W., F. HUYGENS, A. GOONETILLEKE a T. GARDNER. *Real-Time PCR Detection of Pathogenic Microorganisms in Roof-Harvested Rainwater in Southeast Queensland, Australia. Applied and Environmental Microbiology[online]*. 2008, **74**(17), 5490-5496 [cit. 2019-05-10].
- [10] ZENG, Lingwen, Lihua WANG a Jiao HU. *Current and Emerging Technologies for Rapid Detection of Pathogens*. RINKEN, Toonika a Kairi KIVIRAND, ed. *Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis [online]*. InTech, 2018, 2018-03-21 [cit. 2019-05-15].
- [11] WULFF, G. & SARHAN, A. *The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. Angew. Chem. Int. Ed.* 11, 341–345 (1972).
- [12] LAW, Jodi Woan-Fei, Nurul-Syakima AB MUTALIB, Kok-Gan CHAN a Learn-Han LEE. *Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. Frontiers in Microbiology[online]*. 2015, **5** [cit. 2019-05-15].
- [13] SMOLINSKA-KEMPISTY, Katarzyna, Antonio GUERREIRO, Francesco CANFAROTTA, César CÁCERES, Michael J. WHITCOMBE a Sergey PILETSKY. *A comparison of the performance of molecularly imprinted polymer nanoparticles for*

- small molecule targets and antibodies in the ELISA format. Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2019-05-10].
- [14] VASAPOLLO, Giuseppe, Roberta Del SOLE, Lucia MERGOLA, Maria Rosaria LAZZOI, Anna SCARDINO, Sonia SCORRANO a Giuseppe MELE. *Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2011, **12**(9), 5908-5945 [cit. 2018-05-03].
- [15] UZURIAGA-SÁNCHEZ, Rosario Josefina, Sabir KHAN, Ademar WONG, Gino PICASSO, Maria Isabel PIVIDORI a Maria Del Pilar Taboada SOTOMAYOR. *Magnetically separable polymer (MIP-MP) for selective analysis of biotin in food samples. Food Chemistry* [online]. 2016, **190**, 460-467 [cit. 2019-03-19].
- [16] VLATAKIS, George, Lars I. ANDERSSON, Ralf MÜLLER a Klaus MOSBACH. *Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. Nature* [online]. 1993, **361**(6413), 645-647 [cit. 2019-05-15].
- [17] LIU, J. Q. & WULFF, G. *Functional mimicry of the active site of carboxypeptidase A by a molecular imprinting strategy: cooperativity of an amidinium and a copper ion in a transition-state imprinted cavity giving rise to high catalytic activity. J. Am. Chem. Soc.* **126**, 7452–7453 (2004).
- [18] BAI, W. & SPIVAK, D. A. *A double-imprinted diffraction-grating sensor based on a virus responsive super-aptamer hydrogel derived from an impure extract. Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2095–2098 (2014).
- [19] HOSHINO, Y. *et al. Recognition, neutralization, and clearance of target peptides in the blood stream of living mice by molecularly imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody. J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6644–6645 (2010).
- [20] BEN AISSA, A., A. HERRERA-CHACON, R.R. PUPIN, M.D.P.T. SOTOMAYOR a M.I. PIVIDORI. *Magnetic molecularly imprinted polymer for the isolation and detection of biotin and biotinylated biomolecules. Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2017, **88**, 101-108 [cit. 2019-03-19].
- [21] NISHINO, Hidekazu, Chin-Shiou HUANG a Kenneth J. SHEA. *Selective Protein Capture by Epitope Imprinting. Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2006, **45**(15), 2392-2396 [cit. 2019-05-15].
- [22] SARPONG, Kwabena Agyarko, Wanzhen XU, Weihong HUANG a Wenming YANG. *The Development of Molecularly Imprinted Polymers in the Clean-Up of Water Pollutants: A Review. American Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2019, **10**(05), 202-226 [cit. 2019-05-19].
- [23] LEE, H., S. M. DELLATORE, W. M. MILLER a P. B. MESSERSMITH. *Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. Science* [online]. 2007, **318**(5849), 426-430 [cit. 2019-05-10].
- [24] GAO, Ruixia, Lili ZHANG, Yi HAO, Xihui CUI a Yuhai TANG. *Specific removal of protein using protein imprinted polydopamine shells on modified amino-functionalized*



- magnetic nanoparticles*. *RSC Adv* [online]. 2014, **4**(110), 64514-64524 [cit. 2019-05-10].
- [25] ZHAO, Yayun, Yuhai TANG, Jun HE, et al. *Surface imprinted polymers based on amino-hyperbranched magnetic nanoparticles for selective extraction and detection of chlorogenic acid in Honeysuckle tea*. *Talanta* [online]. 2018, **181**, 271-277 [cit. 2019-05-10].
- [26] ERTÜRK, Gizem a Bo MATTIASSON. *Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors*. *Sensors* [online]. 2017, **17**(2) [cit. 2019-05-15].
- [27] SINGH, M., GUPTA N. a RAGHUWANSHI R. *Epitope Imprinting Approach to Monitor Diseases*. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* [online]. 2017, **11**(2) [cit. 2019-03-19].
- [28] YANG, Kaiguang, Lihua ZHANG, Zhen LIANG a Yukui ZHANG. *Protein-imprinted materials: rational design, application and challenges*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **403**(8), 2173-2183 [cit. 2019-05-10].
- [29] RAMSTORM O, MOSBACH K. *Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials*. *Curr Opin Chem Biol*. 1999;3:759–764.
- [30] AHERNE, A.; Alexander, C.; PAYNE, M.J.; PEREZ, N.; VULFSON, E.N. *Bacteria-mediated lithography of polymer surfaces*. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8771–8772.
- [31] AHMED, A., J. V. RUSHWORTH, N. A. HIRST a P. A. MILLNER. *Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2014, **27**(3), 631-646 [cit. 2019-05-22].
- [32] JIA, Mengfan, Zhong ZHANG, Jinhua LI, Xin MA, Lingxin CHEN a Xingbin YANG. *Molecular imprinting technology for microorganism analysis*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, **106**, 190-201 [cit. 2019-05-15].
- [33] BOWEN, Jenna L., Panagiotis MANESIOTIS a Chris J. ALLENDER. *Twenty years since ‘antibody mimics’ by molecular imprinting were first proposed: A critical perspective*. *Molecular Imprinting* [online]. 2013, **1** [cit. 2019-05-15].
- [34] ERTÜRK, Gizem a Bo MATTIASSON. *Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors*. *Sensors* [online]. 2017, **17**(2) [cit. 2019-05-19].
- [35] BAGGIANI, Claudio, Laura ANFOSSI a Cristina GIOVANNOLI. *MIP-based immunoassays: State of the Art, limitations and Perspectives*. *Molecular Imprinting* [online]. 2013, **1** [cit. 2019-05-19].
- [36] ERMIŞ, Nihal. *Preparation of Molecularly Imprinted Polypyrrole Modified Gold Electrode for Determination of Tyrosine in Biological Samples*. *International Journal of Electrochemical Science* [online]. 2018, , 2286-2298 [cit. 2019-05-19].

- [37] LI, Xunjia, Hai-Feng JIAO, Xi-Zhi SHI, Aili SUN, Xiujuan WANG, Jiye CHAI, De-Xiang LI a Jiong CHEN. *Development and application of a novel fluorescent nanosensor based on FeSe quantum dots embedded silica molecularly imprinted polymer for the rapid optosensing of cyfluthrin. Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, **99**, 268-273 [cit. 2019-05-19].]
- [38] LIN, Zheng-zhong, Hong-yuan ZHANG, Lu LI a Zhi-yong HUANG. *Application of magnetic molecularly imprinted polymers in the detection of malachite green in fish samples. Reactive and Functional Polymers* [online]. 2016, **98**, 24-30 [cit. 2019-05-16].
- [39] RAMSTORM O., MOSBACH K. *Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials. Curr Opin Chem Biol.* 1999;3:759–764
- [40] KUTNER, Włodzimierz a Piyush Sindhu SHARMA. *Molecularly imprinted polymers for analytical chemistry applications.* London: Royal Society of Chemistry, [2018].
- [41] AKBARZADEH, Abolfazl, Mohamad SAMIEI a Soodabeh DAVARAN. *Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. Nanoscale Research Letters* [online]. 2012, **7**(1) [cit. 2019-05-15].
- [42] CYWINSKI, Piotr. *Fluorescent Molecularly Imprinted Polymers in Sensing of cAMP and cGMP. Journal of Physical Chemistry & Biophysics* [online]. 2013, **03**(01) [cit. 2019-05-19].
- [43] MONICI, Monica. *Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications* [online]. Elsevier, 2005, 2005, s. 227-256 [cit. 2019-05-10]. Biotechnology Annual Review.
- [44] WILLIAMS, S.C., Y. HONG, D.C.A. DANAVAL, M.H. HOWARD-JONES, D. GIBSON, M.E. FRISCHER a P.G. VERITY. *Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. Journal of Microbiological Methods* [online]. 1998, **32**(3), 225-236 [cit. 2019-05-10].
- [45] Dostupné z: [https://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/microscopy/fluomic.html](https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fluomic.html)
- [46] Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>
- [47] ZHOU, Wen-Hui, Chun-Hua LU, Xiu-Chun GUO, Fa-Rong CHEN, Huang-Hao YANG a Xiao-Ru WANG. *Mussel-inspired molecularly imprinted polymer coating superparamagnetic nanoparticles for protein recognition. J. Mater. Chem* [online]. 2010, **20**(5), 880-883 [cit. 2019-05-19].
- [48] Dostupné z: <http://www.gapa-vahy.cz/produkty-fluorescencni-mikroskop-kern-obn-147-detail-18157>.
- [49] AHMED A.; RUSHWORTH, J.V.; HIRST, N.A.; MILLNER, P.A. *Biosensors for whole-cell bacterial detection. Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, **27**, 631–646.

- [50] BAGER, F, M MADSEN, J CHRISTENSEN a F.M AARESTRUP. *Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant Enterococcus faecium on Danish poultry and pig farms. Preventive Veterinary Medicine* [online]. 1997, **31**(1-2), 95-112 [cit. 2019-05-10].
- [51] HENNEKINNE, Jacques-Antoine, Marie-Laure DE BUYSER a Sylviane DRAGACCI. *Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2012, **36**(4), 815-836 [cit. 2019-05-10].
- [52] BOLE A.L.; MANESIOTIS P. *Advanced Materials for the Recognition and Capture of Whole Cells and Microorganisms. Adv. Mater.* **2016**, 5349–5366.
- [53] DAVID, M.Z., DAUM R.S. *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, 23, 616–687.